

Anyagcsere-betegségek szűrése tandem tömegspektrometriával

Dr. Karg Eszter, Dr. Túri Sándor
SZTE Gyermekgyógyászati Klinika

Millington javasolta 1990-ben a tandem tömegspektrometria (MS/MS) alkalmazását újszülöttek anyagcsere-betegségeinek szűrésére. Az MS/MS módszert eredetileg a zsírsav oxidációs zavarok és organikus aciduriák vizsgálatára dolgozták ki, vagyis acilkarnitineket határoztak meg vele vérmintákból. (Az acilkarnitinek a karnitin és zsírsav összekapcsolódása-kor keletkező molekulák. A karnitin ebben a formában szállítja a mitokondriumokba ill. mitokondriumokból a zsírsavakat. Az acil csoport, vagyis a zsírsav lánc hossza és szerkezete alapján az észtereket acetilkarnitinnek (C2), proprionilkarnitinnek (C3), ... dekanoilkarnitinnek (C10) stb. nevezzük).

Később az MS/MS módszert aminosav mérésekre is kifejlesztették, s a technika finomulásával a 90-es évek közepére lehetővé vált a nagyszámú mintából történő automatizált szűrővizsgálat.

A meghatározásokhoz a vérvétel a 48-72 h között történik. A szűrőpapírra itatott vércseppeket 1 órás szárítás után, 24 órán belül kell a laboratóriumba juttatni. A megfelelő mintavétel rendkívül fontos, ettől függ a meghatározás pontossága. A fertőtlenített bőrről az első cseppet letöröljük, majd a szűrőpapíron jelzett karikákat, a vért csak az egyik oldalra cseppentve, de a másik oldalt is átitatva, kitöltjük. Vénás vérvétel esetén a vérvételi eszközből vagy heparinos kapillárisból cseppentünk a papírra, a vért a szűrőpapírra önteni tilos. Ha a mintavétel nem megfelelő, a labor visszautasítja a meghatározást "Nem megfelelő mintavétel" megjegyzéssel.

A szűrőpapírból 3 mm-es korongokat vágunk ki, ez helyes mintavétel esetén 3,2 μ l vért tartalmaz. A vérmintákból belső standardokat is tartalmazó metanolba extraháljuk az aminosavakat és acilkarnitineket. A belső standardok hidrogén atom helyett egy vagy több deutériumot tartalmazó, de egyébként a vizsgálni kívánt anyagokkal teljesen megegyező aminosavak és acilkarnitinek. Az extrahált mintákat derivatizáljuk, ezzel a mérés érzékenységét növeljük, majd a tandem tömegspektrométerbe injektáljuk.

A tömegspektrométer egy analitikai műszer, mely elektronikus úton méri a molekulák, részecskék tömegét. A műszer a tömeg alapján azonosított molekulák mennyiségét is képes megmérni, és az anyag kezdeti koncentrációját megadni. Azonban ugyanakkora tömeghez, molekulasúlyhoz több, különböző szerkezetű anyag is tartozhat, tehát önmagában egy tömegspektrométer nem elég specifikus. A specificitást azzal lehet fokozni, ha több tömegspektrométert kötünk egymás után. Az újszülöttkori szűrésekhez a két MS/MS, vagy tandem tömegspektrométer már megfelelő specificitást biztosít.

Nagyon kis anyagmennyiségekkel dolgozunk, a gépbe kb. 0,3 μ l vérnek megfelelő mennyiségű mintát juttatunk. Ebből egy 2 perces mérés során kb. 30-40 anyag mennyiségét határozzuk meg. A nagy változást a tandem tömegspektrometria tehát azzal hozta, hogy egyetlen vizsgálattal számos metabolit és annak megfelelő anyagcsere-betegség vált szűrhetővé. Kérdés azonban, hogy a megnőtt lehetőségek közül melyik betegségek azok, amelyeket valóban érdemes vizsgálnunk.

Ahhoz, hogy egy anyagcsere-betegséget újszülöttkori szűrésre alkalmasnak tartsunk, több kritériumnak is meg kell felelnie. Ezek közül néhány: 1. Elég gyakorinak és súlyosnak kell lennie ahhoz, hogy társadalmi szinten problémát jelentsen; 2. A szűrő módszernek egyszerűnek és megbízhatónak kell lennie; 3. A betegségnek kezelhetőnek kell lennie, de a teljes tünetmentesség elérése ma már nem feltétel, 4. Lehetőség legyen a betegek gondozására, követésére.

Az alábbiakban a metabolikus zavar jelleg alapján felsoroltunk néhány betegséget, amelyek szűrésének lehetősége és igénye felmerült. Az, hogy ezek közül ténylegesen mely betegségek kerüljenek szűrésre, jelenleg is nemzetközi vita tárgyát képezi és országonként eltérő.

Aminosav anyagcsere-zavarok:

Fenilketonuria

Jávorfaszörp betegség

Tirozinémia I. típus

Citrullinémia I (argininoszukcinát szintáz hiány, ASS)

Arginosuccinic aciduria (arginoszukcinát liáz hiány, ASL)

Homocisztinuria

Zsírsav oxidációs zavarok

Rövid-láncú acil-CoA dehidrogenáz hiány (SCAD)

Közép-láncú acil-CoA dehidrogenáz hiány (MCAD)

Hosszú-láncú hidroxil-acil-CoA dehidrogenáz hiány (LCHAD a, b)

Nagyon hosszú-láncú acil-CoA dehidrogenáz hiány (VLCAD)

Karnitin-palmitoil tanszferáz hiány (CPT-1)

Karnitin transzport zavara (CT)

Organikus savak metabolizmusának zavara

Béta-ketotioláz hiány

Glutársav acidémia, 1 típus (GA-I)

Isovaleriánsav acidémia (IVA)

Metilmalonsav acidémia (MMA)

Propionsav acidémia (PA)

3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG)

3-Metilkrotonil CoA karboxiláz hiány (MCC)

Multiplex karboxiláz hiány

A 90-es évek közepén elkezdett szűrővizsgálatok szerint a komplex szűréssel 1:3 400, ill. 1:4 700 között van a kiszűrt betegek száma. Az MCAD gyakorisága kb. megegyezik a fenilketonuriáéval.

Azonban a várható előnyök mellett már az első közlemények felhívták a figyelmet a kiterjesztett szűrésből adódó problémákra: 1. A megfelelő határérték megállapítása fontos: cél a tévesen negatív eredmények elkerülése anélkül, hogy a tévesen pozitív esetek száma túlságosan magas legyen. 2. Az MS/MS vizsgálat szűrővizsgálat, az emelkedett metabolit háttérében lévő betegség igazolására azonban definitív módszer is rendelkezésre kell, hogy álljon.

A határérték függhet a meghatározás módszerétől, szűrt populáció genetikai tulajdonságaitól és egyéb biológiai tényezőktől. Így pl. az álpozitív

esetek 50%-a a nagyon kissúlyú vagy intenzív ellátást igénylő újszülöttek közül kerül ki. Valószínűleg különböző határértékeket kell majd megállapítani az érett, koraszülött, alacsony súlyú, ill. parenterálisan táplált újszülöttekre. Befolyásolhatják az értékeket bizonyos gyógyszerek is, pl. valproic acid, benzoic acid. További probléma, hogy bizonyos metabolitok mennyisége lényegesen változik a születést követő hetekben. Ezért az ismételt vizsgálatokhoz is más-más határérték koncentrációkat kell alkalmazni.

A másik kihívás a diagnózis bizonyítása az MS/MS-sel történt szűrővizsgálat után. Bizonyos kórképekben, pl. fenilketonuria, MCAD, a tömegspektrometriás vizsgálat elég a definitív diagnózis felállításához. Azonban ilyenkor is érdemes mutáció analízist végezni, mert különböző mutációk eltérő prognózissal járhatnak.

Más esetben két különböző betegség ugyanannak a metabolitnak a megszorodásához vezethet, pl. a propionilkarnitin emelkedést észleljük a propionil CoA dehidrogenáz hiány, vagy a metilmalonil CoA mutáz hiány esetében, sőt kobalamin zavarok, B12 hiány is jelentkezhet ilyen változással.

Az is előfordul, hogy a tandem tömegspektrométer mégsem elég specifikus, két eltérő betegség során felhalmozódó két különböző vegyületet azonosnak jelez, pl. nem tudja elválasztani az izobutirilkarnitint a butirilkarnitintól, s míg az izobutirilkarnitin emelkedése a valin katabolizmus zavarára utal, a butirilkarnitin a zsírsav béta oxidáció zavara esetén halmozódik fel.

Ez utóbbi két csoport esetén további laboratóriumi eljárásokra (enzim meghatározások, mutáció analízis) van szükség a diagnózis felállításához.

A tandem tömegspektrometriával nagyon hatékony módszer áll az újszülöttkori anyagcsere-betegségek szűrésének rendelkezésére. A módszer azonban még állandó változás, fejlődés alatt áll: a nagy változások nem közvetlenül a műszeres mérésben, de részben a minta előkészítésben, döntően pedig az eredmények értékelésében ill. a kötelező szűrésre alkalmasnak ítélt betegségek összetételében várhatók.